

등록특허번호 제0150193호(1998.12.01.) 1부.

특0150193

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁸ G01N 31/00	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	1998년 12월 1일 특0150193 1998년 06월 12일
(21) 출원번호 (22) 출원일자	특1989-001116 1989년 01월 31일	(65) 공개번호 (43) 공개일자 특1989-013478 1989년 09월 23일
(30) 우선권주장	8602237 1988년 02월 02일 영국(GB)	

- (73) 특허권자 비이오코드 인코포레이티드 제임스 에이치. 뢰텐버그
미합중국 매사추세츠주 02630 번스타일 빌 웨이 275
- (72) 발명자 마이클 존 웨이스
영국 켄트주 싯팅보존시 버어클리 코오트 3
데이빗 윌리엄 브라운
영국 켄트주 패비성 바이싱우드 도로트 36
치윌슨
- (74) 대리인

심사관 : 김호여

(54) 이커 회합물의 결합방법

요약

내용 없음.

원제서

[발명의 명칭]

이커 회합물의 결합 방법

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 면역분석에 의해 화학제 미커 회합물들을 결합하는 방법과 이 분야에서 이러한 결합을 수행할 수 있는 분석 키트에 관한 것이다. 특히 본 발명은 액체 제품, 특히 유체유와 같은 기체를 기체로 하는 제품에서 이커 회합물들을 결합하는 것에 관한 것이다.

세계의 여러 지역에서, 그리고 많은 심한 이환 제품들과 관련하여 겪게 되는 문제점은 모조 제품이 있다는 것이다.

세계 도처에서, 상인들은 고객들이 그들의 물질을 다른 것들로부터 식별할 수 있게 하기 위해서 특인으로 식별가능한 외관을 갖는, 이들이 판매하는 물질을 제공한다. 결과적으로 이들의 고객들은 어떤 품질 기준과 특인으로 식별가능한 물질의 외관을 관련시키는 것을 획득하여 이들이 그러한 기준들을 인식시킨다면 다른 것들에 선호하여 특인으로 식별가능한 외관이 제공된 물질들을 구입할 것이다.

많은 고객들이 특인으로 식별가능한 특정 외관이 제공되어 있는 물질들을 선호하기 시작하면, 상인들은 모조품에 영향받기 쉬워진다.

모조품은 진품이 갖는 물질의 외관과 혼동할 정도로 유사한, 특인으로 식별가능한 외관을 갖는 물질로 이루어져 있다. 모조 물질에 제공된 특인으로 식별가능한 외관을 본 고객들은 그들이 진품을 산다는 기대대로 물질들을 사게 된다.

특인으로 식별가능한 외관을 갖는 물질을 제공하는 방법들이 많이 공지되어 있다. 일반적으로 특인으로 식별가능한 외관은 직접 물질에 제공되거나 또는 종말에 연결된 문, 액안대, 표지, 포장지 또는 등기에 제공된다. 특인으로 식별가능한 외관은 액안대, 식별가능한 형상 또는 구조, 식별가능한 마킹 또는 이들의 조합일 수 있다. 특히 비탄직한 특인으로 식별가능한 외관은 상표이다.

모조품의 물질은 진품의 물질과 동일하거나 다를 수 있다. 흔히 모조품의 물질은 동일하나, 물질에 떨어진다.

모조품을 제조할 수 있는 여러 가지 방법들이 있다. 한 방법에서, 제품 제조자들은 진품의 외관을 모방하여 특인으로 식별가능한 외관을 갖는 모조 물질을 제공한다. 또 다른 방법으로, 제품 제조자들은 진품의 물질이 갖는 특인으로 식별가능한 외관에는 아무런 영향을 미치지 않아 진품의 물질의 품질 저하시키거나 대체시킨다.

그러한 문제점의 한 예는 제조자의 기계를 진품에 첨가함으로써 유통되는 또는 기계를 기재로한 다른 제품의 품질 저하시키는 것이다. 그러한 품질 저하는 모조 제조업체에게 재정적으로 손해를 줄뿐만 아니라, 성능을 저하시켜서 소비자에게 해를 끼치고 결과적으로 진품의 평판을 좋지 않게 한다.

이러한 문제점을 극복하는 방법으로는, 제품에 영표를 포함시키는 것이 이전에 제안되어졌다. 그러나, 그

리한 전략은 쉽게 모방된다. 그러나 육안으로 쉽게 검출되지 않는 마커를 포함시키면, 질이 저하된 정도 (콘제이션)를 결정하기 전에 쉽게 제외되었을지 모르는 제품의 샘플에 물리적 분석을 위한 기초 설정, 예컨대, 크로마토그래피를 할 필요가 있다. 결과적인 지체는 예컨대, 백업(back-up) 실험실 편의를 쉽게 이용할 수 있는 플드의 배급자에게 있어서 편리하지 못하고 오조절을 방지하는 기술의 효용을 낮춘다.

오조절을 검출하려는 시도에 대한 이 분야에서 사용될 수 있는 방법이 분명히 필요하다.

유전 마커 출현 공개 번호 EP-A-0260829에는 물질 내에서 염소화된 페놀, 특히 헥사클로로페놀을 동정하고 이 물질 내에서 상기 화합물의 농도를 측정하기 위해 사용될 수 있는 오노클론 및 폴리클론 항체가 기술되어 있다. 양에서 서브유닛에 헥사클로로페놀이 함유된 샘플 또는 방출제로서 물질에 첨가한다는 것이 기록되어 있다. 그러나, EP-A-0260829에는 제품, 즉, 육안으로 식별가능한 외관을 가진 물질 내에서 염소화된 페놀을 동정하는 것이 기술되어 있지 않다. 더욱이 EP-A-0260829에는 마커 화합물로서 염소화된 페놀을 사용하는 것이 기술되어 있지 않다. 특히 EP-A-0260829에는 오조제로부터 잔존을 구별하기 위한 검출 방법과 염소화된 페놀을 결합시킬 것을 기술하고 있지 않다.

피레트로이드 살충제의 면역분석법의 개발이라는 주제로 캐나다 오타와에서 1996년 8월 10-15일에 열린 살충제 화학 제 6차 국제회의에서 M. J. 우라이스 알맹은 광고 발효제로 디클로로비닐 시클로프로판 카르복실산 및 n-페닉시벤조산의 단위결합의 합합체(conjugate)와 이 단계를 합합체들을 사용하여 제조된 폴리클론 항체들을 기술하였다. 또한, 종자, 꿀 및 토양에서 사이피페토린 대사물, n-페닉시벤조산 및 디클로로비닐 시클로프로판 카르복실산의 분석도 기술하였다. 그러나, 이기 화합물로서 n-페닉시벤조산 또는 디클로로비닐 시클로프로판 카르복실산을 사용하는 것과 관련하여 식별가능한 외관을 갖는 어떤 물질들에서 이 둘 중 어떤 화합물을 면역분석에 의해 검출한 것은 전혀 기술되어 있지 않다.

본 발명에 따라서, 수성 폐쇄 내에서 마커 화합물의 샘플을 제공하고 이 마커 화합물에 특이적인 면역분석에 의해서 실험 내에서 마커 화합물을 동정하는 것으로 이루어진, 육안으로는 검출할 수 없으며 본질적으로 수용성인, 제품이 결합된 마커 화합물의 존재를 검출하는 방법을 제공한다.

마커 화합물은 매우 다양한 방법으로 제품과 결합될 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 마커 화합물은 제품의 일부 또는 전체, 제품과 관련된 용기, 포장 또는 표지의 일부 또는 전체에 존재할 수 있다. 마커 화합물은 보통 제품을 포함한다. 다만, 예컨대, 제품과 결합하여, 제품과 결합하여 존재할 수도 있다. 예를 들면, 마커는 제품 포장 또는 표지에 존재할 수 있다.

제품은 그제이거나 유제일 수 있다.

그제 제품의 예는 제약학적 정제, 캡슐 및 분말; 살충제, 제초제, 살균제 및 비료들은 농약제제의 그제 배합물; 유강과 같은 직물; 카세트 테이프, 플로피 디스크, 컴퓨터 디스크 및 유기기 레코더와 같은 기록물; 텔레비전 세트 컴퓨터 및 라디오와 같은 전기 제품; 자동차와 같은 운송 기체가 있다.

유제 생산물의 예는 유황유, 가솔린, 디젤 및 액화 석유 제품과 같은 기름을 기재로한 제품; 드로; 음료; 화장품; 포도주, 위스키, 세리, 진 및 보드카와 같은 음료; 시럽, 유착제 및 탄화물과 같은 액체의 제와 배합물; 액체의 농화학 배합물; 및 공업 용제가 있다. 제품은 바람직하게는 액체, 바람직하게는 윤활유와 같은 기름을 기재로 한 제품이다.

마커 화합물은 육안으로는 검출할 수 없으며 본질적으로 수용성이어야 한다. 마커 화합물은 면역분석에 의해 검출될 수 있어야 하며 또한 그것이 마킹하는 제품과 결합될 수 있어야 한다는 것으로 이해된다. 면역분석 기술분야의 당업자는 마커 화합물로 사용하기에 적합한 화합물들을 동정하는 데 어려움이 없을 것이다.

마커 화합물로 사용하기에 적당한 유용한 화합물은 탄수화물, 수소화물, 및 산소의 질소로부터 선택될 하나 이상의 헥사클로로화물 함유하는 유기 화합물 및 그의 염일 것이다. 염의로 하나 또는 그 이상의 헥사클로로화물로는 예를 들면, 염소, 브롬 또는 요오드 염자와 같은 할로겐 원자, 한 원자, 한 원자로도 존재할 수 있다. 바람직한 화합물들은 카르복실산, 카르복실산 에스테르, 개관, 알코올, 페놀, 아민, 아민산, 니트릴 및 에이트 및 그의 염일 것이다. 특히 바람직한 화합물들은 방향족 카르복실산, 예컨대, 벤조산; 페놀; 다가 알코올 및 페놀류의 에테르; 아미노산; 알데하이드; 알데하이드; 지방; 탄수화물, 예컨대, 당 및 다당류; 액산; 및 폴리알콜, 예를들면 대목시도복소산 및 리보복소산이 있다.

제품은 유황유와 같은 기름을 기재로한 제품일 때, 마커 화합물로 사용되는 화합물은 바람직하게는 log P가 -2.5 내지 +5.0, 바람직하게는 -1.5 내지 4.5, 가장 바람직하게는 0 내지 4.0 범위이다.(본원에서 사용된 log P는 25°C에서 옥탄올과 물 사이의 화합물의 분배계수의 대수이다). 따라서, n-페닉시벤조산은 예를들면, log P가 3.9이다.

경제적으로 활성 형태의 특정 화합물에 대해 선택적인 항체들을 생산하는 것이 가능하다. 편집적인 분석 기술에 의해서는 경제적으 활성 형태의 화합물들을 구별하기가 어렵기 때문에(특히, 단지 미량의 화합물만이 존재하여 이용될 때), 경제적으로 활성된 마커 화합물들을 사용하는 것이 특히 어렵다.

마커 화합물로 사용하기에 적합한 화합물이 n-페닉시벤조산으로 밝혀졌으나, 마킹해야 할 제품에 해가 되지 않고 함께 혼합될 수 있는 한 다양한 화합물들이 상기 목적에 적합하다는 것으로 이해된다. 따라서, 마킹해야 할 제품에 따라서, 기름-용해성, 수-용해성 및 그제-용해성 화합물들을 마커 화합물로서 사용해야 한다.

제품이 액체일 때, 마커 화합물은 바람직하게는 우연하고 액체 제품에 용해되어 그제 존재가 여부의 분석에 의해서만 검출될 수 있어야 한다. 이는 또한 바람직하게는 냄새가 있어야 한다.

바람직하게는 단지 미량의 마커가 사용된다. 전형적으로 마커 화합물은 1 ppb(part per billion) 내지 25 ppb(part per million) 범위의 농도로 제품과 혼합될 것이다. 바람직하게는, 농도가 100 ppb 내지 15 ppb이고 더욱 바람직하게는, 1 ppm 내지 10 ppm일 것이다. 따라서 예를 들면, 마커 화합물의 농도는 약 10 ppm까지이며 마커 화합물에 따라 소량의 ppb도 검출하기에 충분할 수 있다.

25 ppm 또는 그 이하의 미카 회합을 농도를 검출하는 능력은 본 발명에 따른 방법의 특별한 잇점이다. 따라서 단지 소량의 미카 회합만을 사용함 필요가 있다.

또 다른 특징에 따라, 본 발명은 -2.5 내지 5.0 범위의 log P를 갖는 용액으로 검출되지 않으며 본질적으로 수중성인 미카 회합들을 1 ppb 내지 25 ppm을 함유한 기체를 기체로한 재료를 제공한다.

미카 회합들이 수성 매체에서 재분포 혼합되면, 면역분석은 그 샘플에 직접 행할 수 있고 필요에 따라, 고정물을 제거하기 위해 여과시킨 후 행할 수 있다. 그렇지 않으면 미카 회합들을 수성 용액에 녹여야 한다.

일반적으로, 수성 용액 내에 미카 회합을 샘플을 제공하는 것은 재료으로부터 미카 회합들의 용해 추출; 재질의 수성 용매로의 희석; 여과; 증발; 및 미카 회합들의 고체상 추출, 예컨대, 이온교환 수지 또는 크로마토그래피(예컨대, 실리카겔을 사용하여) 중에서 선택된 하나 또는 그 이상의 단계들을 포함할 것이다. 미정된 기체-기체 재분포의 경우는, 용매 추출이 필요하다.

분석에 앞서 재료로부터 미카 회합들을 추출하기 위해 선택된 용제는 자연적으로 제공 및 미카의 특성에 의존한다. 재질 및 미카의 특성에 따라, 용제는 일반적으로 물; 탄화수소, 예컨대, 벤젠, 톨루엔, 크실렌, 헥산, 헵탄 및 옥탄; 알콜사이드, 예컨대, 디메틸포름사이드; 할로겐화탄, 예컨대, 클로로포름, 브로모메탄, 클로로포름 및 사염화탄소; 에테르, 예컨대, 디에틸 에테르, 디옥산 및 테트라하이드로퓨란; 아미드, 예컨대, 디메틸포름아미드 및 디메틸아세트아미드; 니트랄, 예컨대, 아세토니트랄; 알코올, 예컨대, 메탄올, 에탄올 및 프로판올; 에스테르, 예컨대, 에틸 아세테이트; 및 케톤, 예컨대, 아세톤 중 하나 또는 그 이상을 포함할 것이다. 바람직하기는 용제는 물 및/또는 수-혼화성 유기 용매를 포함한다. 시험 용액 유기 *페닉시비전조산으로 미정된, 적당한 수를 용해는 하산과 같은 기능을 차지, 아세토니트랄과 같은 수-혼화성 유기 용제 및 물의 혼합물이다. 알코올 추출 용제는 트리클로렌(트리클로*헥사실릴)이미드(노베라)와 같은 혼합물도 포함한다. 사용된 용제 시스템은 이후의 면역 분석을 위해 적절적으로 적당한 수성상 내에서 추출된 미카 회합들을 바람직하게 생산한다.

면역분석은 선택된 미카 회합들에 대하여 미리-제조된 항체를 사용하여 수행한다. 이러한 항체는 특별한 회합들에 대해 특이한 모노클론 또는 폴리클론 항체를 수득케하는 공지 기술에 의해 만들어진다. 바람직하기는, 모노클론 항체가 사용된다.

항체는, 용액을 의해 회합물(항원)에 노출시켰을 때 반응하는 *페닉시비전조산으로 알려진 항체-생성 세포에 의해 동물에서 생성된 단백질이다. 이들 항체는 이들의 생성을 자극하는 특별한 회합물에 특이하게 결합한다.

동물이 면역한 회합물로 면역되었을 때 동물의 비강에서는 항체-생성세포를 만든다. 모든 회합물이 면역한 것은 아니다. 일반적으로 2,000 이하의 분자량을 갖는 회합물은 면역하기 어렵다. 그렇지만, 특수 회합물은 단백질과 같은 보다 큰 면역한 당체에 합체로 화학적으로 결합시키고 그 결과 특성의 면역한 합체로 동물을 면역시키에 의하여 상기 회합물에 특이한 항체(합체으로 알려진)도 얻을 수 있다.

2-단계 화학 반응에서 이관능성(bifunctional) 분자를 사용하여 면역한 당체에 항원에 부착시킬 수 있다. 이것은 면역 반응을 개선할 수 있는 당체 및 항원 사이에 스페이서 아미드(spacer arm)를 제공한다. 회합물이 당체 또는 이관능성 분자에 화학적으로 결합되기 위해서, 이것은 그 지체가 관능성기를 함유하여 한다. 바람직한 관능성기는 아미노기, 히드록실기 및 카르복실기이다.

동물이 면역한 물질로 면역할 때 매우 다양한 상이한 항체-생성 세포들이 자극된다. 이러한 반응에 의해 생성된 항체는 폴리클론 항체로서 공지되어 있다.

특정한 회합물에 대하여 만들어진 폴리클론 항체는 동일한 특이성으로 그 회합물에 모두 결합되지 않는다. 그렇지만, 회합물에 대해 동일한 특이성 및 친화도로 모두 결합되는 항체를 얻을 수 있다. 이들 항체는 모노클론 항체로서 알려져 있다.

이러한 모노클론 항체를 얻기 위해서, 항체-생성 세포를 면역하면 동물의 비강으로부터 먼저 추출한다. 이들 세포는 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마(hybridoma)를 생성한다. 예컨대, 폴리 에틸렌 글리콜로 처리하여 융합시킬 수 있다. 하이브리도마는 전구체 항체-생성 세포와 같은 항체로 생성할 수 있으나, 극히 안정; 실험실에서 연속 성장할 수 있다. 항체 생성세포와 융합하기에 적당한 다수의 골수종 세포는 유지되어 있으나 잘 알지기 쉽게 구입할 수 있다. 쉽게 구입할 수 있는 적당한 골수종 세포의 예로는 P3X-63-Ag8-653이다. 이 세포는, 예컨대, ATCC, CRL 1580으로 미정된, 페달렌드루 로크필드에서 알려진 티임 세포 클락으로부터 구입가능하다.

항체-생성 세포와 골수종 세포가 융합되었을 때, 결과 형성된 하이브리도마 세포를 융합하지 않은 세포로 분리시키고, 반복되는 재분 희석으로 분리한다. 클로날된 하이브리도마를 시험하여 원하는 항체를 생성하는지를 결정한다. 이 시험은, 예컨대, 경쟁적 효소-결합 면역측정 분석(ELISA)에 의해 수행할 수 있다. 고정형으로 결합되는 회합물들의 모노클론 항체의 결합을 저해하는 유리 회합물의 능력을 평가하기 위한 ELISA 시험 시스템에 유리 회합물들 첨가하여 회합물에 대한 특이성 및 친화도를 평가할 수 있다.

특정한 하이브리도마가 선택되었을 때, 주어진 기술을 사용하여 모노클론 항체를 많은 양으로 쉽게 생성할 수 있다. 비단디나, 이들 항체를 얻고주머니(horse radish) 퍼옥시다제 또는 알카리 퍼옥시다제와 같은 효소로 리브라시할 수도 있다.

회합물에 대한 모노클론 항체 및 폴리클론 항체를 생성하는 기술이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 기술이 설명된 참고문헌에는, 디스테인, 최, 이, 테이저, Vol 265, P. 495(1978)와 야카비 및 프레스 1981(보통) 및 1981(77년)에 의해 발간되고 마누키스, 에타일 및 테이저, Vol. 265, P. 495(1978)와 야카비 및 프레스 1981(보통)의 방법 Vol 70 및 Vol 73 면역화학 기술 부분 A 및 B를 포함한다.

다른 특징으로, 본 발명은 *페닉시비전조산에 대한 신규한 모노클론 항체를 포함한다.

본 발명에 따른 방법들은 샘플 내에 미카 회합물을 정량적으로 또는 정성적으로 동정하는 것을 포함할 수 있

다. 이 방법은 비활적하게는 미가 복합물을 정량적으로 측정하는 것을 포함한다. 이 방법에서, 질이 저하된 정도를 확인할 수 있다.

원재료의 정제에 의한 미가 복합물의 분석은 효소-매개 면역분석 및 샌드위치 면역측정 분석을 포함한다. 다른 면역분석법이 사용될 수 있으나, 경제적 효소-결합 면역측정 분석 (ELISA)에 의해 바람직하게 수행된다. 분석 결과의 신뢰적인 검출은 배색 수단 또는 화학발광 또는 형광과 같은 대체 검출 수단에 의해 행할 수 있다.

그러한 검출 방법은 복잡한 실험 장비가 필요하지 않기 때문에 필드 조정에 매우 적합하다. 따라서 본 발명의 또 다른 특징에 따라, 수성 매체내에 상기 미가 샘플을 제공하는 수단, 미가 복합물에 특이적인 항체를 포함하는 면역분석 수단, 면역분석을 실시하는 검출 수단 및 전술에 대해 예상되는 공과와 면역분석 결과와 비교하는 수단을 포함하는, 폭안으로 결합될 수 있으며 본질적으로 수용성인, 재제에 결합된 미가 복합물의 존재를 검출하기 위한 분석 키트가 제공된다.

수성 매체 내에 상기 미가의 샘플을 제공하기 위한 수단은 마커로 수성 용액으로 하는데 필요한 임의의 용제 및/또는 불필요한 고품질을 제거하기 위한 여과 수단 및/또는 고체 상 추출 방법(예를 들면, 이온 교환 수지를 함유하는 필름 또는 실리카와 같은 크로마토그래피 매체)을 포함할 수 있다.

면역분석 수단은 적당량 공급된 모노클론 또는 폴리클론 항체를 포함할 수 있다. 이는 또한 고체상에 결합될 수 있는 항변도 함유할 수 있다.

면역분석 결과를 탐지하기 위한 검출 수단은 예를 들면, 비색 변광로 생산하고/하거나 측정하기 위한 수단일 수 있다. 따라서 검출 수단은 효소와 효소의 기질을 함유할 수 있다. 효소는 합성, 항-합성 항체, 또는 항-합성 항체에 대항하는 2차 항체에 부착될 수 있다. 효소의 예에는 알코올주변에 퍼옥시다제 및 알칼리성 포스포에스테라제 있다. 기질의 예에는 o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드; 에마라이트 시그널 시약 (Amrite Signal Reagent, 여마삼 인터내셔널 PLC로부터 구입가능); 및 o-니트로페놀 포스포에스테르가 있다. 항체와의 결합도, 분광광도계와 같은 외부 검출장치에 사용될 수 있다. 이 방법에서는, 미가 복합물의 존재뿐만 아니라 존재하는 정도 측정할 수 있어서, 재제의 질이 저하된 정도를 나타낼 수 있다.

전술에 대해 기대되는 결과와 면역분석 결과를 비교하기-위한 수단은 전술에 대해 기대되는 결과를 나타내는 지시물(예를 들면, 색상 차트, 구경 테이퍼 또는 구경 곡선을 포함한)을 포함할 수 있고 또는 미립진 전광과 동일한 미립진 샘플 샘플(알려지지 않은 샘플에 대해 분석될 것임)을 포함할 수 있다.

키트에는 바람직하게는 전술의 물질에 제공된 학원으로 사할될 수 있는 외관에 대한 설명이 제공된다. 예를 들면, 키트는 지침 물질의 삽포에 대한 설명이 제공될 수 있다.

키트 내의 분석 수단 제공 능력은 제품원과 거리가 먼 환자의 제공 해급자와 같은 필드의 사람이 제품을 옮기는 과정없이 곧 검사해볼 수 있게 한다.

본 발명은 다음 실시예들을 참고하여 더 설명될 것이다.

[실시예 1]

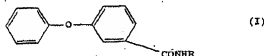
[마커(marker) 복합물로서 이용하기 위해 고안된 화학물의 단백질 결합체 제조]

a-페닉시벤조산(합성, 이후에 "PBA"로 언급)의 일련의 단백질 결합체를, 먼저 화학 합성에 의해 PBA로부터 적절한 반응 유도제를 제조한 다음, 단백질과 유도제를 결합시켜서 제조한다. ¹⁴C방사성 라벨을 갖는 유도제를 제조함으로써 이후의 단백질 결합체를 탐지하고, 시약의 재가를 점검하고 합성을 갖는 단백질의 부위를 개선한다.

i) PBA 유도제의 제조

a-페닉시벤조산을 벤젠 내에서 염화 탄소닐과 반응시켜서 상응하는 염화벤조산을 수득하여, 수산화나트륨을 존재 하에 4-아미노부티르산과 연속적으로 반응시킨 다음, 산 가수 분해함으로써 하기 일반식 (1)의 유도제 a)를 수득한다:

화학식 1



상기식에서 R은 $-(CH_2)_2COOH$ 이다.

중간체의 염화벤조일과 b) 글리신 및 c) 글리실 글리신을 수산화 나트륨 존재 하에 반응시키고나서, 산 가수 분해하여, b) RO- CH_2COOH 일반식 1의 유도제 및 c) RO- $CH_2CONHCH_2COOH$ 일반식 1의 유도제의 두 개의 상이한 유도제를 수득한다.

수성 테트라하드로푸란 내에서 벤질 4-아미노부티레이트 및 3-(3'-디메틸아미노프로필)-1-에틸 카르보디이미드를 반응시켜서 RO- $CH_2COOCH_2CH_2$ 일반식 1의 복합물을 수득하고 여기서 테트라하드로푸란 내에서

막단상팔리디움 촉매로 수소 첨가 분해하여 일반식 1의 유도체 a)를 제조할 수 있다.

유도체들은, 균일한 용액에 얻어질 때까지 첨가되는 테트라하드로푸란 및 용 내에 탄산나트륨 또는 중탄산나트륨을 화합물과 함께 첨가하고 증발건조시킴에 의해 회와 나트륨 염(용액에서 쉽게 용해)으로 전환시킨다.

i) 단핵질 결합체의 제조

여의 나트륨염 형태인 소(1)에서 기술한 바와 같이 제조된 유도체를 각각 용액 용해시키고 pH 8으로 조절하고, 0°C로 냉각한다. 또한 0°C로 냉각된 9-(9'-디메틸아미노-프로판)-1-에틸 카르보디이미드의 용액을 유도체 나트륨염에 첨가하고 이소우레아 카르복살레이트가 얻어질 때까지 2분 동안 정치시키도록 한다.

각각의 유도체를 종류별 알미온수(水)에 용해시키고 여과시킨 후 단핵질 중 하나에 결합시킨다:

소 원형 알부민 (분자량 약 68,000)

닭 감마 글로불린 (분자량 125,000-750,000)

키홀 핑펑트 헤르시안인 (분자량 3,000,000-7,000,000)

용액을 취하여 섞으면서 단핵질에 첨가하여 부하를 수평하고 결합을 완결시키는 수시간 동안 5°C에서 혼합물을 유지시킨다. 필요하면 pH 8로 조정한다. 부하된 단핵질을 빠른 유속으로 변화시키면서 5 내지 7일 동안 pH 7.3의 염수 용액과 연속 용액으로 분석시키고, 부하를 ^{14}C 방사능 측정법에 의해 결정한다.

[실시예 2]

[모노클론(monoclonal)항체의 생성]

P8A 및 소 혈청 알부민의 결합체(15 μ l P8A/단백질의 용)를 사용하여 항체를 생성한다. P8A-소혈청 알부민을 실시예 1 i)의 절차로 실시예 1)의 유도체 a)를 사용하여 제조한다.

6 마리 쥐들(Balb/c, 암컷)을 P8A 결합체(0.1 ml, 50 μ g)와 프루인드(Freund's complete adjuvant)의 1:1 유액으로 피하를 통해 면역시킨다. 각 동물은 프루인드 애주번트와 함께 3주 간격으로 3 회 주사를 받는다. 유사한 양성반응도, 또 다른 6마리 동물은 보다 높은 투여량의 결합체(200 μ g)를 받아들이고, 12마리 동물로부터 얻은 혈청 샘플을 효소-결합 면역 분석(ELISA)에 의해 P8A에 대한 특이 결합을 시험한다.

가장 높은 결합 농도로 항체를 생산하는 동물로부터 배양을 제거하고, 비세포(脾細胞)는 PK-63-AGB-659 골수종세포(미합중종 페달렌드주 로크펠러시 아메리칸타입 검체 컬렉션으로부터 ATCC CRL 1580으로 구입 가능)와 결합에 사용된다. 하이브리도마(hybridoma) 세포를 96-웰(well) 미세액정 판에 분배시킨다. 세포 성장에 있어서, 상동액 조직 배양 유체들을 ELISA에 의하여 항체 생성 여부에 대해 시험한다. ELISA 방법에서 고형상 P8A 표적에 대한 항체 결합의 지체를 측정하기 위하여 유리 P8A를 시판 시스템에 첨가함으로써 특이성을 평가할 수 있다. 여러 양성 반응부터 세포를 성장시켜 세포 저장물을 생성한 후 재한 회식 기술을 종료한다. 또한 세포성장에서 이어서, 결과 형성된 상동액을 상기와 같이 시험하고, 여러 양성형의 내용물을 성장시키고, 다시 종료한다. 두 번째 종료에 이어서 양성으로 확인된 웰 내의 세포를 예비 분석 전개를 위한 충분한 모노클론 항체를 함유하는 상동액을 생성시키도록 성장시킨다.

중간-기근 요구에 대한 충분한 모노클론 항체를 생성하기 위해, 5개의 클론 세포 하이브리도마를 항체-중추 복수(Balb/c)의 성장을 위해 선택한다. 하이브리도마 프리프라이즈-처리 (pristane-primed)된 알 마리 암컷 쥐(Balb/c)를 하이브리도마 세포 10^5 이하로 복강 내에 접종한다. 복수액을 수확하고, 한대 모노클론하게 동물 저장한다.

항체를 실험실 내 취하여 섞은 조직 배양 용기 내에서 하이브리도마 세포를 성장시켜서 제조한다.

클론 세포 하이브리도마 중 하나의 샘플을 수확 번호 8901101로 1989년 1월 10일에 영국, 살리스버리 SP4 0UG, 포스트 다듬에 소재한, 동물 미생물 및 연구를 위한 PHL 센터, 동물 세포 배양의 유럽 협력체(EUACC)에 기탁한다.

[실시예 3]

[미립된 용액의 분석]

n-페녹시비탄산 10 ppm을 함유하는 마립된 용액(생 상표면 리모룰 X(Rimular X))로 구입가능)를 제조한다. 다양한 배분율(1)로 마립된 오일 및 미오일 오일을 함유하는 일련의 샘플 2ml를 제조한다.

허기 방법에 의해, P8A를 각 오일로부터 분석을 위해 추출한다.

[오일로부터 P8A의 추출]

1. 각분 정정미 수첨물, 오일 샘플을 알분 가능한 용기에 둔다. 0.05M 트리스/HCl (pH 7.5)내의 20% 아세토니트릴(1 부피) 및 백산(5부피)을 오일에 첨가한 후 용기를 병행한다. 혼합물을 1분 동안 흔들고 결과 형성된 현탁액을 분리하도록 한다. 이것은 약 30초가 소요된다.

2. 분취량은 1회용 플라스틱 피펫을 사용하여 분리된 혼합물을 보다 낮은 상으로부터 취해서 3ml의 96% 분도 플루트(Bard Elvitt)정정(조수 크로마토그래피로부터 얻어진 이온 교환 수지 정제)에 적용시킨다. 추출 샘플에 인산을 가하여 검정용 용액시키고 검정용 용액수 4 x 1ml의 분취량으로 채취한다.

3. 정정용 염수 내 트윈(Tween) 20 0.05 부피의 용액 2ml를 용출시킨다. 이 용액은 염의 결합의 P8A를 제거한다. 각각의 회수된 P8A 용액을 허기 방법에 의해 경쟁적 효소-결합 면역분석 분석(ELISA)에 적용시킨다.

[면역 분석 방법(비색법으로 검출)]

1. 플라스틱 웰/류분틀 실시에 1에서 기술된 바와 같이 제조된 PBA-단 감마 글로불린 결합체의 고정된 수 준으로 코팅 처리한다. 이 코팅을 수행하기 위해, 10 μ l을 농도의 100nM 결합체의 측정된 부피 분율을 웰/류부틀 내에 준다. 이를 조심스럽게 조밀한 온도에서 고정된 시간동안 배양하고 재생성 가능한 수준과 고칠을 종착에 의해 수행한다. 코팅 시기 후, 웰을 세척하고 4℃로 저장할 수 있다.

2. 분석용 PBA-항유 용액을 실시에 2에서 기술된 바와 같이 제조된 제한 수준의 용액에 모노클론 항체의 존재 하에 예비-코팅처리된 웰 내에 준다. 항체의 샘플을 1:1000로 희석하여 사용한다. 분석의 기본은 결합제로서 웰의 표면상에서 부동성인 PBA 및 용액 내 PBA 사이의 이 항체의 결합에 대한 경쟁이다. 고정된 기간 후, 웰 내 용액을 제거하고 물을 세척한다. 세척 후, 웰 내에 남아 있는 항체는 부동화 PBA에 결합되므로, 남아있는 항체의 수준은 유려 용액 내에 앞서 존재하는 PBA의 수준에 반비례한다.

3. 두 번째 항체-효소 결합체의 용액을 웰에 첨가한다. 사용된 두 번째 항체 효소 결합체는 100nM/웰의, 1:1000 희석된 IgG(1에서 바이오시절로부터 구입가능한 토끼 anti-면역 글로불린 G)에 결합된 완가리신 포스파타제(phos phatase)이다. 이 결합체는 남아서 웰 내 부동화 결합체에 결합된 항체의 첫 번째 항체에 결합한다. 두 번째 항체-효소 결합체를 과량으로 첨가하고, 다시, 결합되지 않은 용질을 세척하여 제거한다. 세척 후, 웰 내에 남아있는 두 번째-항체-효소 결합체의 수준은 삼기 단계 2에서 결합된 첫 번째 항체 수준에 정비례한다.

4. 두 번째 항체-효소 결합체의 효소에 대한 기질을 함유하는 용액을 웰에 첨가하고, 존재하는 효소의 수준을 색다른 생성물 형성을 측정하여 결정한다. 기질은 10% 디에탄올아민 완충액(pH 9.8 1mg/ml)의 p-니트로 페닐 포스페이트 에나도름 알(시그마 케미칼로부터 시그마 104 포스파타제 기질로서 구입 가능)이다. 항체으로 색다른 생성물의 형성을 수와 비광 기시광선 흡수 분광 분석기 (예 610, 마이크로볼륨메트 리미티드(디나테크))를 사용하여 405nm에서 측정한다. 다양한 백분율의 미량된 오일을 함유하는 오일 샘플의 백색 분석 결과의 두 세트들 하기 표 1에 제공한다.

결과를 샘플 내 미량된 오일의 백분율로서 설명한다.

[표 1]

샘플번호.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
계산치	75	25	100	0	50	0	33	100	10	50
세트A 판독치	47	14	100	0	50	0	29	100	0	42
세트B 판독치	76	33	93	0	56	0	22	118	31	55

[실시예 4]

[분석 키트의 조립 및 마립된 유효율의 분석에 있어서 분석 키트의 사용]

3개 이하의 유효율 모조 샘플에 시험하기에 적절한 분석키트를 조립한다. 키트는 하기(1)-(11)을 포함한다:

- (1) PBA-단 감마 글로불린 결합체로 코팅시간 5개의 플라스틱 웰(하기한 바와 같이 제조함);
- (2) 5개의 이온 교환 수지 필터, (콘스 크로마토그래피로부터 얻어진 5ml의 NH₄ 버드 엘루트(Bond Elut)필터);
- (3) 0.05M 트리스/HCl (pH 7.5)내 40% 아세트나트륨 2n. 및 액산 8n이 이루어진 10ml 부피의 추출 용매 5개;
- (4) 10 ppm의 n-페녹시벤조산을 함유하는 유효율 샘플 1개(마립된 진점의 샘플을 나타냄);
- (5) n-페녹시벤조산을 함유하지 않은 유효율 샘플 1개;
- (6) 0.05% w/w 트림 20(플라독시메틸렌-솔벤트 오노라우레이트, 시그마 케미칼 캠퍼나로부터 구입 가능, 카탈로그 번호 P1379)를 함유하는 인산염 완충액수로 10배 희석시킨 2ml 부피의 PBA-특이적 모노클론 항체 5개(PBS, 복소이로부터 경제 형태로 구입가능);
- (7) 1부피의 항체-효소 결합체 (OAKO 라이티드로부터 구입가능, 카탈로그 번호 P161, 생구 면역 글로불린 내지 도끼 면역 글로불린과 결합한 양고수양이 퍼옥시다제(peroxidase)를 포함함);
- (8) 화학발광 기질(에크타라이트 시그널 사약, 에크트스 인터네셔널 PLC로부터 구입 가능, 카탈로그 번호 LAN 4400);
- (9) 염수 내 0.05% (v/v) 트림 20(ST)로 이루어진 세척;
- (10) 증류수로 이루어진 필터 세척; 및
- (11) 지시 시이트 1개

[PBA-단 감마 글로불린 결합체로 코팅시킨 플라스틱 웰의 제조]

실시에 1에 가솔린 배와 같이 재조된 고점원 수준의 PBA-유 감미 글로불린 결합제로 플라스틱 튜브를 코팅시킨다. 코팅을 수행하기 위해, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로, 500ml 결합제의 측정된 분취량을 튜브에 넣는다. 이후, 실온에서 3시간 동안 배양하고 흡착에 의해 코팅의 재생산성 수준을 알린다. 코팅 시간 후, 실시에 3에 가솔린 염수/트윈 음액(ST)로 튜브를 세척하고, 건조시키고 바람직하게 4°C에서, 필요할 때까지 건조기에 저장한다.

[마킹된 글로불린 분석에 있어서 분석 키트의 사용]

1. 분석을 수행하기 위해서, 첫 번째 단계에서 제조자의 지시에 따라 화학 발광 기질을 제조한다.
2. 실시에 3의 방법과 따라, 5 부피의 추출 용액 및 5개의 이온 교환 평형을 사용하여 글로불린의 알려진지 않은 3개의 샘플과 키트에 속한 글로불린의 두 개의 샘플을 추출한다. 아주 걸림을 2개의 걸림 2ml 분취량으로 세척한다.
3. 걸림 각각을 2ml 부피의 PBA-특이적 모노클론 항체를 함유하는 작은 유리병 내로 2ml 분취량의 세액으로 용출시킨다.
4. 병의 내용물을 혼합한 후, 5 혼합물 각각으로부터 적어도 500 μl 를 PBA-유 감미 글로불린 결합제로 코팅시킨 5개의 플라스틱 튜브에 이송한다. 5분 후 튜브 내 용액을 따라내고 튜브를 세액으로 한번 세척한다.
5. 항체-요소 결합제 용액 500 μl 를 튜브 각각에 첨가한다. 5분 동안 배양시킨 후 튜브의 내용물을 따라내고 튜브를 세액으로 다섯 번 세척한다.
6. 화학 발광 기질(1ml)을 튜브에 첨가하고 2분 후 휴대용 발광기를 정지한 튜브 광도계(디노계) 레브레 아토리 리미티드로부터 구입 가능)의 사용을 위해 제조자의 지시에 따라 광출력을 측정한다. 자시의 측량은 0- 내지 999 범위 내 3 디지털 수이다.
7. 4주 동안, 루가치 작동에 의해 수행된, 일련의 35 분석에 대해 병행의 재생산성을 평가한다. 일련의 실험에 대한 편차의 중간 분석율(CV)은 0.14이다. 분석을 정확하게 수행하는 경우, 포지티브 대조물(보다 높은 독성): 네가티브 대조물(보다 높은 독성)의 비율은 0.12 ± 0.056 (즉, ± 1 표준편차(SD))인 것으로 밝혀졌다. 알려지지 않은 오일에 대한 0.725 이상의 같은 가능한 오조 샘플을 나타낸다.

[실시에 5]

[마킹된 가솔린의 분석]

가연(加餵) 가솔린 및 비가연 가솔린의 13ml 샘플을 3가지 수준의 PBA(10.5 및 2.5 ppm)로 미정한다. 이들을 플라스틱 용액(2ml, 0.05M, pH 7.5)으로 추출한다. 실시에 3에 가솔린 배와 같이 추출물을 분석하고 미정되지 않은 가솔린 추출물로 제조한 표준 교정곡선을 사용하여 PBA 양을 얻는다. 측정되는 추출 효율을 가능케하고 측정치의 이론치 사이의 비교적 허용가능한 방사라벨링된 PBA를 함유하는 샘플들을 제조한다. 결과를 표 2에 나타내었다.

[표 2]

마킹되지 않은 가솔린 추출물의 교정 곡선에 대해
분석한 수정 샘플들에 대한 이론치 및 측정치의 비교

샘플	피석된 10 ppm 추출물					피석된 5 ppm 추출물				
	10 ppm					5 ppm				
가연 가솔린	대조물	추출물	1:2	1:4	1:8	대조물	추출물	1:2	1:4	추출물
이론치(방사화학)	0	46*	23	11.5	5.7	23	11.4	5.7	11.4	
측정치	0.9	47	22.5	11.0	6.4	29	13.5	6.3	13.5	
비가연 가솔린										
이론치(방사화학)	0	33	16.2	8.1	4.1	15.5	7.7	3.9	7.5	
측정치	0.9	41	18.5	7.0	3.8	14.5	6.2	3.4	7.6	

* 모든 값은 ppm으로 한다.

이들 결과는 13ml의 가솔린으로부터 2ml의 트리스 완충액 내로 PBA를 추출함으로써 얻어진 농도 효과를 설명하며, 만약 분석으로 PBA로 마킹된 가솔린이 마킹되지 않은 가솔린과는 다를 수 있음을 납득하도록 설명한다.

[실시예 6]

[마킹된 액체의 분석]

20ppm의 고형 PBA를 함유하는, 파라세타몰(아세트아미노판-가배온 종류의 진정제 및 해열제) 및 나프록센(비-스테로이드 항-염제)의 마킹된 샘플들을 제조한다. 각 분량(1g)을 20ml의 유리병 내 10ml의 PBS/트윈

(실시에 4에 기술됨)에 첨가한다. 마찬가지로 두가지 물질에 대하여 마킹되지 않은 분석 대조물을 제조한다. 반응 발생 임플란트시 PBA를 PBA/트윈 내로 추출한다. 원심분리시켜 용해되지 않은 물질을 분리한 후, 상등액의 샘플부분량(250 μ l)을 250 μ l의 PBA 액체적 형제에 첨가하고 실시예 4에 기술된 바와 유사하게, 분석 기트를 사용하여 분석한다. 표 3에 나타난 결과로부터, 마킹된 액체가 마킹되지 않은 액체와는 명백하게 구별됨을 알 수 있다.

[표 3]

액체	마킹되지 않음*	마킹됨*	비율(%)
파라세타몰	400	288	72
	394	275	70
	377	253	75
	378	278	74
	251	205	73
	266	203	76
	396	303	78
	398	287	67
	517	357	69
	480	378	79
	469	379	80
나프록센	평균비율 = 74	표준편차 = 4.2	편차율 = 5.7%
	517	350	68
	503	337	67
	365	200	73
	313	226	72
	279	185	66
	269	220	81
	269	204	76
	245	153	64
	평균비율 = 71	표준편차 = 5.7	편차율 = 8.0%

* 실시예 4에 기술된 루브 정도계에 나타난 값을 읽는다.

[실시에 7]

[마킹된 항로의 분석]

20ppm의 PBA를 함유하는 오메 코팅의 샘플을 제조한다. 2ml의 마킹된 물질과 2ml의 마킹되지 않은 물질을 작은 유리시험관에 넣고 초기 건조되도록 안전한 공기 흐름 내에서 증발시킨다. 2ml의 PBS/트윈(실시에 4에 기술됨)을 오일성 잔류물에 첨가하고 루브 내용물을 불백성에 의해 격렬하게 혼합한다. 불보다 뜨거운, 불용성 오일을 원심분리에 의해 분리하고 상등액의 샘플 분취량을 실시예 6에 기술된 바와 같이 분석한다. 표 5에 나타난 결과로부터 마킹된 항로가 마킹되지 않은 샘플들과는 명백하게 다름을 알 수 있다.

[표 4]

항목	마킹되지 않음*	마킹됨*	비율(%)
오래코풍	866	104	12
	851	243	29
	655	107	16
	722	133	18
	710	126	18
	782	196	25
평균비율 = 20 표준편차 = 6.2 편차율 = 31.6%			

* 낙타넬 값을 실시에 4 에 기술된 뷰브 광도계로부터 읽는다.

새로운 접근으로서 마킹된 및 마킹되지 않은 오래 코풍을 PBA/트윈으로 10배로 희석시키고 실시에 6에 기술된 바와 같이 직접 분석한다. 표 5에 결과를 나타내었으며 이 새로운 방법도 마킹되지 않은 항료와 마킹된 항료 사이에 명백한 차이가 있음을 보여준다.

[표 5]

항목	마킹되지 않음*	마킹됨*	비율(%)
오래코풍	736	499	88
	760	522	69
	494	324	66
	382	287	70
	401	233	58
	385	257	68
	352	210	60
	484	307	63
	640	426	67
평균비율 = 65.4 표준편차 = 4.2 편차율 = 6.4%			

[실시에 8]

[마킹된 물료의 분석]

20ppm의 PBA를 함유하는 불변당시인 위스키 샘플을 제조한다. 마킹되지 않은 위스키와 상응하는 샘플 및 마킹된 위스키를 PBA/트윈으로 4배로 희석시키고 실시에 6에 기술된 방법을 사용하여 샘플 분취량(250 μ l)을 분석한다. 표 6에 나타난 결과는 마킹된 위스키가 마킹되지 않은 위스키와는 명백하게 다른을 설명한다.

[표 0]

요인	마감되지 않음*	마감됨*	비율(%)
위스키	375	119	31
	366	158	39
	381	180	47
	449	110	25
	435	104	24
	427	109	26
	431	95	22
	421	116	28
	387	117	30
	440	86	19
	412	122	30
	396	122	32
	353	107	30
	474	115	24
	452	106	23
	446	111	25
평균비율 = 28.4			표준편차 = 6.9
			편차율 = 2.4%

* 낙락된 값은 실시예 4 에 기술된 류브 광도계로부터 얻어진다. 이

실시예에서 생성된 시그널을 전개시키는데 약 20 분이 소요됨에 유의한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

제품에 부착하여, 제품에 대하여 불활성이며 제품과 미리 결합되어 있지 않은 합편을 마커로서 제품과 결합시킨 다음, 이후에 제품을 확인하기 위한 수단으로서 상기 합편을 이에 상보적인 결합 부재에 특이적으로 결합시킴에 의하여 제품 내에서 합편을 검출하는 단계로 구성되는, 제품을 미량하고 나서 제품을 확인하기 위한 수단으로 제품 내에서 미거 화합물을 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 합편 마커가 제품에 직접 첨가되는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 합편 마커가 제품과 혼합되는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 제품이 액체인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 제품이 석유 제품인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 제품이 고체이고 합편은 제품의 표면에 적용되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 합편 마커가 제품과 결합된 태그(tag)나 표지자에 첨가되거나 부착되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 합편 마커가 α -테트라시켄조산인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상보적 결합 부재가 합편에 대한 합제인 방법.

정구항 10

(a) 실업적 석유 제품과 (b) 통상적으로는 석기 석유 제품에 결합되지 않는 합연 머커를 함께 혼합하여 포함하는 미립자 제품.